



УДК 577.152.02

## КООРДИНАЦИОННО-ИОННАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

## II. СВЯЗЫВАНИЕ ПЕНИЦИЛЛИНАМИДОГИДРОЛАЗЫ ЧЕРЕЗ КОМПЛЕКСЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ИОНЫ КОБАЛЬТА, НИКЕЛЯ И ЖЕЛЕЗА \*

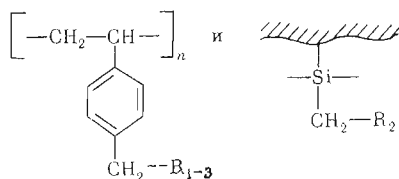
*Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А.**Институт элементоорганических соединений Академии наук СССР, Москва*

Изучен процесс координационно-ионной иммобилизации пенициллинамидогидролазы с использованием в качестве комплексообразователей ионов переходных металлов Co(II), Ni(II), Fe(III), а в качестве носителей — гетерополистирола, содержащего остатки этилендиамина, диэтилентриамина и триэтилентетрамина, и силохрома, содержащего остатки диэтилентриамина. Определенные комбинации металлов, стационарных лигандов и носителей позволяют получить высокоактивные препараты иммобилизованного фермента.

Координационно-ионная иммобилизация ферментов [1–3], как и адсорбционная иммобилизация, особенно привлекательна простотой многократного использования носителя. Ранее нами [1] была описана иммобилизация пенициллинамидогидролазы из *E. coli* (КФ 3.5.1.11) через образование смешанного сорбционного комплекса фермента и хелатирующей аминной группировки (стационарного лиганда) носителя с ионами Cu(II). В отличие от ионов меди, имеющих координационное число 4, в настоящей работе для иммобилизации применены шестикоординационные ионы Co(II), Ni(II) и Fe(III), также образующие прочные комплексы с аминами [4] и имеющие близкие с Cu(II) ионные радиусы. Стационарными лигандами носителей служили остатки би-, три- и тетраденатных аминов. Наиболее перспективными в плане координационно-ионной иммобилизации представляются носители на основе силохрома и гетерополистирола [1], которые и использовались в данной работе.

Активность образцов иммобилизованного фермента определяли по рачемическому N-фенацетилфенилглицину, L-изомер которого энантиоселективно гидролизует пенициллинамидогидролазой. Условия проведения ферментативной реакции, поляриметрический метод кинетического контроля за ходом и энантиоселективностью гидролиза, а также методы расчета активности фермента и содержания его на носителе описаны нами ранее [5].

В работе синтезированы носители на основе силохрома и полистирола [1] следующей структуры:



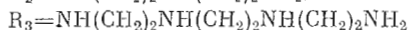
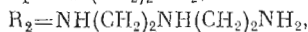
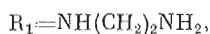
\* Сообщение I см. [1].

**Характеристики носителей и свойства иммобилизованной пенициллинамидогидролазы**

| Носитель           | Ион металла | Содержание стационарного лиганда, ммоль/г носителя | Содержание ионов металла, ммоль/г носителя | Удельное содержание металла, ммоль металла/ммоль лиганда | Содержание фермента, мг белка/г носителя | Связывание белка при иммобилизации, % | Активность образца, ммоль/г носителя·ч | Сохранение активности связанного белка, % |
|--------------------|-------------|--|--|--|--|---------------------------------------|--|---|
| ПС*-R <sub>1</sub> | Co(II)      | 2,80   | 0,40                                       | 0,14   | 30                                       | 75                                    | 10 000                                 | 73  |
| »                  | Ni(II)      | 2,80   | 0,25                                       | 0,09   | 29                                       | 73                                    | 2000                                   | 17  |
| »                  | Cu(II)      | 2,80   | 0,40                                       | 0,14   | 17                                       | 43                                    | 6000                                   | 78  |
| »                  | Fe(III)     | 2,80   | 0,84                                       | 0,30   | 32                                       | 80                                    | 1700                                   | 12  |
| ПС-R <sub>2</sub>  | Co(II)      | 1,60   | 0,82                                       | 0,51   | 70                                       | 70                                    | 8400                                   | 25  |
| »                  | Ni(II)      | 1,60   | 0,50                                       | 0,31   | 70                                       | 70                                    | 7300                                   | 22  |
| »                  | Cu(II)      | 1,60   | 0,50                                       | 0,31   | 45                                       | 45                                    | 7400                                   | 37  |
| »                  | Fe(III)     | 1,60   | 0,75                                       | 0,47   | 77                                       | 77                                    | 6600                                   | 19  |
| ПС-R <sub>3</sub>  | Co(II)      | 1,80   | 1,00                                       | 0,56   | 31                                       | 77                                    | 3600                                   | 26  |
| »                  | Ni(II)      | 1,80   | 0,75                                       | 0,42   | 34                                       | 85                                    | 2300                                   | 15  |
| »                  | Cu(II)      | 1,80   | 0,42                                       | 0,23   | 26                                       | 65                                    | 1500                                   | 13  |
| »                  | Fe(III)     | 1,80   | 1,00                                       | 0,56   | 30                                       | 75                                    | 1700                                   | 12  |
| Sil-R <sub>2</sub> | Co(II)      | 0,25   | 0,19                                       | 0,76   | 25                                       | 63                                    | 2000                                   | 18  |
| »                  | Ni(II)      | 0,25   | 0,25                                       | 1,00   | 24                                       | 60                                    | 2700                                   | 25  |
| »                  | Cu(II)      | 0,25   | 0,28                                       | 1,12   | 17                                       | 43                                    | 2100                                   | 27  |
| »                  | Fe(III)     | 0,25   | 0,41                                       | 1,64   | 25                                       | 63                                    | 1200                                   | 11  |

\* ПС — гетеропористый полистирол. Sil — силихром.

где



Для получения комплексов ионов металла со стационарными лигандами носители обрабатывали избытками растворов хлоридов соответствующих металлов. Как следует из представленных в таблице результатов, при такой обработке с ионами металлов координируется лишь часть стационарных лигандов носителя. Это связано, вероятно, не со стерическими факторами, а с электростатическим отталкиванием, возникающим между положительно заряженными фазой носителя и катионами металлов. Для силихрома, в котором содержание стационарного лиганда гораздо меньше по сравнению с их количеством в полистирольных носителях, удельное содержание всех ионов металлов много выше и монотонно возрастает с увеличением прочности сорбционных комплексов [4]. Ионы Fe(III), кроме того, сильно сорбируются на поверхности силихрома, что приводит к аномально большому удельному содержанию ионов этого металла.

Иммобилизацию пенициллинамидогидролазы осуществляли инкубацией металлосодержащих носителей с раствором фермента в 0,1 М фосфатном буфере (рН 8,0) при комнатной температуре. Для всех используемых ионов металла равновесное состояние достигается для полистиролов за 5–10 ч, а для силихрома — за 2–4 ч. Вероятно, большинство стерически доступных и способных к координации групп белковой молекулы участвует в комплексообразовании, так как молярное отношение фермент — металл на носителях составляет  $\sim 1 : 10^3$ , т. е. несомненно осуществляется многоточечное связывание белковой молекулы.

Основные характеристики полученных образцов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы приведены в таблице.

На рис. 1 приведено изменение суммарного содержания белка на носителях в зависимости от вида комплексообразующего иона металла и типа стационарного лиганда. Видно, что переход от четырехкоординационной Cu(II) к шестикординационным ионам для всех использованных носителей позволяет повысить содержание на них белка.

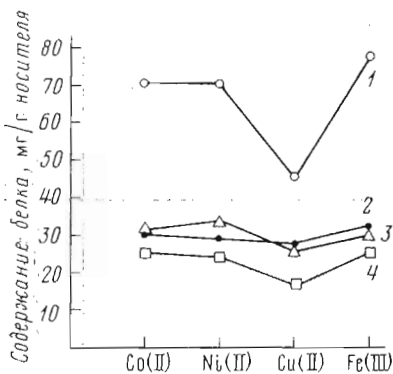


Рис. 1

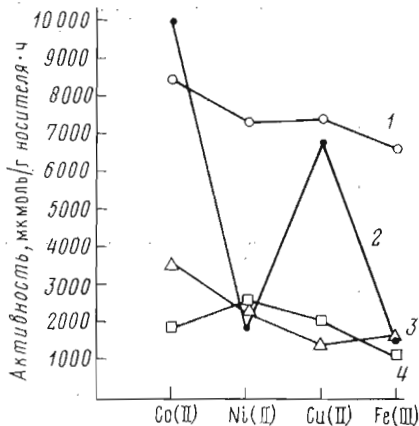


Рис. 2

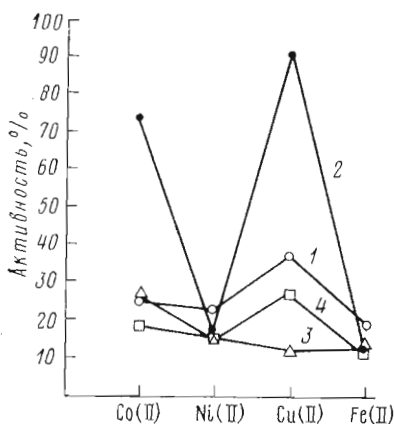


Рис. 3

Рис. 1. Зависимость содержания белка от природы металла-комплексобразователя на носителях. PS-R<sub>2</sub> (1), PS-R<sub>1</sub> (2), PS-R<sub>3</sub> (3) и Sil-R<sub>2</sub> (4)

Рис. 2. Зависимость активности образцов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы от природы металла-комплексобразователя. Обозначения — см. рис. 1

Рис. 3. Зависимость сохранения активности пенициллинамидогидролазы при ее иммобилизации от природы металла-комплексобразователя. Обозначения — см. рис. 1

Однако определение активности образцов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы показывает (рис. 2), что эффективность использования ионов Cu(II) сопоставима с эффективностью применения шестикоординационных ионов. Из рис. 2 видно также, что имеется некоторая тенденция к снижению активности образцов иммобилизованного фермента в ряду Co, Ni, Cu, Fe. Можно также отметить, что активность образцов более «чувствительна» к природе ионов металла, чем связывание белка различными носителями (ср. рис. 1).

Зависимость сохранения активности ферментом после его иммобилизации от природы ионов металлов (рис. 3) близка по характеру к аналогичной зависимости активности (рис. 2) лишь для носителя полистирольного типа с этилендиаминовыми группировками. В этом случае высокая активность фермента, иммобилизованного с помощью ионов Co(II) и Cu(II), обусловлена малой степенью его инактивации при связывании с носителем. В остальных случаях сохранение ферментом активности колеблется в пределах 10–40%.

Структура матрицы носителя также существенно сказывается на свойствах связанного фермента, что видно из сравнительного рассмотрения свойств носителей полистирольного и хромофорного типа, модифицированных одинаковым стационарным лигандом (таблица). По всем показателям при координационной иммобилизации пенициллинамидогидролазы применение полистирольных носителей предпочтительнее по сравнению с си-

лохромом. Примечательно, что в плане сохранения высокой удельной активности фермента использование шестикоординационных ионов не дает преимуществ перед применением ионов  $\text{Cu(II)}$ , аксиальные позиции координационной сферы которых, очевидно, обеспечивают более «удобное» расположение хелатирующих группировок белковой молекулы фермента.

Проведенное исследование показало, что для координационно-ионной иммобилизации пенициллинамидогидролазы может быть использован ряд ионов переходных металлов. Свойства иммобилизованного фермента сложным образом зависят от дентатности стационарного лиганда и природы комплексообразующего иона металла, что указывает на важную роль геометрии и прочности сорбционного комплекса фермента. При этом влияние строения сорбционного комплекса на процесс связывания белка, конечную активность и процент сохранения активности иммобилизованным ферментом в ряде случаев различно. Исследование разнообразных сочетаний стационарных лигандов и металлов-комплексообразователей позволило нам получить ряд высокоактивных (до 10 000 мкмоль субстрата/г носителя·ч) препаратов иммобилизованной пенициллинамидогидролазы (ПС- $\text{R}_1$  с  $\text{Co(II)}$  и  $\text{Cu(II)}$  в качестве металлов-комплексообразователей и ПС- $\text{R}_2$ , см. таблицу).

### Экспериментальная часть

Препарат пенициллинамидогидролазы, содержащий 40% белка, предоставлен Всесоюзным научно-исследовательским институтом антибиотиков. Активность пенициллинамидогидролазы, определенная поляриметрическим методом по гидролизу *N*-фенацетил-*D,L*-фенилглицина аналогично [5], составляла в зависимости от партии образца от 400 до 480 мкмоль субстрата/мг белка в ч.

Синтез исходных носителей с комплексообразующими полнамиными стационарными лигандами описан ранее [1].

Комплексы стационарных лигандов с ионами  $\text{Co(II)}$ ,  $\text{Ni(II)}$ ,  $\text{Fe(III)}$  получали обработкой носителей двукратными избытками 0,1 М растворов хлоридов соответствующих металлов в дистиллированной воде при комнатной температуре до установления равновесной концентрации растворов солей. Контроль за распределением ионов металлов осуществляли спектрофотометрически. Носители отфильтровывали, промывали дистиллированной водой, этанолом и высушивали на фильтре. Содержание стационарных лигандов (по данным элементного анализа) и ионов металлов приведено в таблице.

Иммобилизация пенициллинамидогидролазы на металлосодержащих носителях осуществлялась в соответствии с работой [1].

Содержание белка, процент сохранения активности и активность иммобилизованной пенициллинамидогидролазы определяли аналогично работе [5].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. (1979) Биорган. химия, 5, 757–767.
2. Слободяникова Л. С., Латов В. К., Беликов В. М. (1979) Прикл. биохим. и микробиол., XV, 262–268.
3. Лауринавичус В. А., Кулис Ю. Ю. (1978) Химия природн. соедин., 5, 629–637.
4. Яцмирский К. Б., Васильев В. П. (1959) Константы нестойкости комплексных соединений, Изд-во АН СССР, М.
5. Ямсков И. А., Буданов М. В., Даванков В. А. (1979) Биорган. химия, 5, 604–610.

Поступила в редакцию  
26.XI.1979

COORDINATION-IONIC ENZYME IMMOBILIZATION.  
II. PENICILLINAMIDOHYDROLASE BINDING THROUGH COBALT,  
NICKEL AND IRON COMPLEXES

YAMSKOV I. A., BUDANOV M. V., DAVANKOV V. A.

*Institute of Organo-Element Compounds, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

The process of coordination-ionic immobilization of penicillinamidohydrolase via cobalt (II), nickel (II) and iron (III) complexes was studied. The heteroporous polystyrene and silochrom were used as polymeric supports, whereas their ethylenediamine, diethylenetriamine and triethylenetetraamine moieties served as stationary ligands. A number of combinations of metals, stationary ligands and supports allow to obtain highly active preparations of the immobilized enzyme.

---